

紫杉醇产生菌的紫外诱变

栾云鹏

(西南林业大学, 昆明 650224)

摘要 紫杉醇是一种抗癌的特效药, 对各类癌症具有显著疗效。由于紫杉醇原料的不足是限制应用的难点。在紫杉醇的生产工艺中, 利用微生物发酵法具有一定优势。但是利用此种方法生产的紫杉醇产量较低, 所以关键在于高产菌株的筛选。实验以经初部诱变和生物工程选育的J1-3、Z35-8 45s作为出发菌株。经紫外诱变选育, 紫外灯为18 W, 照射距离21 cm, 分别在45、90、120 s点诱变, 观察诱变后的致死百分率、突变百分率、正变百分率和层析结果, 选育出高产菌株。

关键词 紫杉醇; 紫外诱变; 产生菌; 选育

中图分类号 TQ 923 文献标志码 B

Breeding of Fungi Strains Producing Taxol Using Ultraviolet-irradiation

Luan Yunpeng

Abstract Taxol is a new medicament of resisting for cancer. Fermentation with microbe is a very prospective way to produce Taxol. However, the low Taxol production of the fungi strains limited the wide use of this way in practice. It is important to breed high productive strains. In this experiment the strains J1-3, Z35-8 45s isolated from *Taxus cuspidate* and bred by bioengineering methods were used as start strains. The power of UV was 18W, the distance was 21cm. The irradiation time was 45s \90s \120s respectively. It was observed by dead rate; mutation rate; plus-mutation rate and the result of TLC. The result prove: J1-3, the optimum irradiation time were 90s for UV induced mutation. Z35-8 45s, the optimum irradiation time were 45s induced mutation. The results of TLC indicated that the taxol yield by these two strain were higher than the start strain.

Keywords taxol; UV-irradiation; fungi producing; breeding.

肿瘤的治疗在很大程度上依赖于抗肿瘤药物的开发。在此情况下诞生了紫杉醇。由于紫杉醇具有良好的抗癌活性和独特的抗癌机理, 对于紫杉醇的研究正广泛进行着。紫杉醇是一种复杂的具有抗癌活性的二萜类生物碱, 分子式为 $C_{47}H_{51}NO_{14}$, 分子量为853.92, 目前已在临床上作为乳腺癌、卵巢癌和非小细胞肺癌的一线用药, 治愈率33%, 有效率在60%以上^[1-3]。紫杉醇诱变育种, 实验表明: 寄居在红豆杉属的植物中的一些真菌的次级代谢产物中有紫杉醇存在。而利用真菌生产紫杉醇属于微生物发酵范畴(见图1)。诱变育种是方法之一^[4-5]。

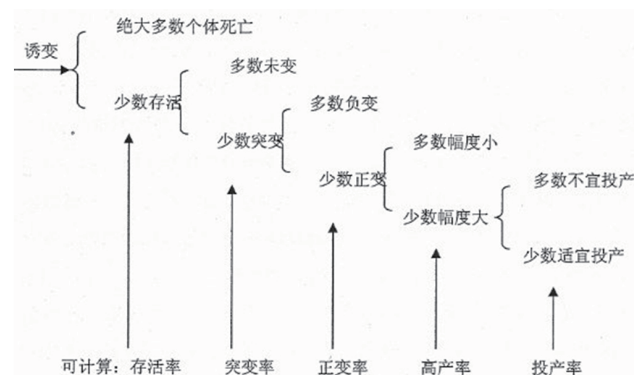


图1 诱变育种产生高产突变株的主要步骤

1 材料和方法

1.1 材料 菌种: 本实验室分离得到的紫杉醇产生菌, 经过几年常规选育和原生质体诱变以及融合获得的二株原生质体融合株J1-3、Z35-8 45s。

培养基: 1 000 mL PDA液体培养基; 1 000 mL PDA固体培

作者简介: 栾云鹏(1980-), 助理实验师, 从事微生物生理研究。

收稿日期: 2012-01-16

养基; S-7液体发酵培养基。

提取与检测: 展开剂为氯仿/甲醇(7/1 V/V); 萃取液为乙酸乙酯; 洗液为乙腈; 显色剂为含1%浓硫酸的香草醛溶液; 照射剂为紫外线照射, 波长228 nm; 配制剂为甲醇。紫杉醇标准样购自Sigma公司。

1.2 实验方法 实验方法流程: 孢子悬液的制备 紫外线诱变 摇瓶发酵 提取。发酵液中紫杉醇的鉴定: 薄层层析法 紫杉醇产生菌的形态观察 产紫杉醇菌株的再选择。

2 数据结果

2.1 形态观察 群体形态: PDA固体培养基是培养这两株菌的优良培养基。菌株J1-3在平板上生长较快, 1或2 d在PDA固体平板上生长的菌落稀疏, 平扁丝絮状, 菌落呈白色, 背面黑色, 无渗出物。Z35-8 45s的生长较前种菌株迅速, 菌落呈白色, 背面呈深粉红色, 手感较黏。28 °C恒温培养适合菌株迅速生长。菌丝形态: 初生菌丝无隔, 次生菌丝有单孔形隔膜, 菌丝多分支, 部分内生, 部分表生, 深褐色, 直径约为2.58~6.45 μm, 有时呈螺旋生长, 未见到菌核或其他菌丝特化形态生长, 无大型子实体产生。孢子形态: 培养两昼夜后镜检观察, 圆形, 绿色亮点。

2.2 致死率 需要在诱变前对孢子悬液计数。从图2和图3可见, 两个出发菌株诱变后的致死率随照射时间的增加而增高。

2.3 诱变率 诱变率是将发生突变的菌株数与存活株数做比较。根据数据表3-1和3-2得出, J1-3菌株紫外诱变率在照射时间90 s时最大; Z35-8 45s菌株在照射时间45 s时最大。

2.4 正变率 正变率是将发生正变的菌株与发生突变的菌株数作比较。正变株是指生长速度迅速、产孢子能力强、层析结果与标样一致的菌株。

3 结论

此实验应用紫外光辐射, 对产紫杉醇菌株J1-3和Z35-8 45s进行

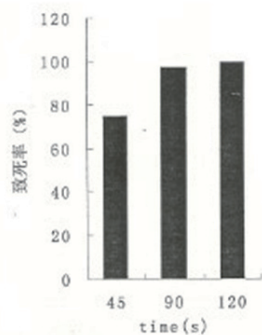


图2 J₁₋₃ 辐射度与致死率变异系数

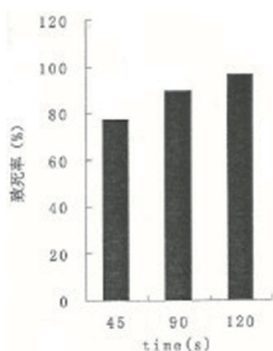


图3 Z₃₅₋₈ 45s 辐射度与致死率变异系数

表1 J₁₋₃ 诱变率

		照射时间 (s)		
稀释度	单位 (个)	45s	90	120s
10 ⁻¹	菌落数	63	14	6
	突变株	23	10	2
	突变率	36.5%	71.4%	33%
10 ⁻²	菌落数	16	3	0
	突变株	6	3	—
	突变率	37.5%	100%	—
10 ⁻³	菌落数	8	0	0
	突变株	5	—	—
	突变率	62.5%	—	—

表2 Z₃₅₋₈ 45 s

		照射时间 (s)		
稀释度	(个)	45s	90s	120s
10 ⁻¹	菌落数	40	27	10
	突变株	28	16	3
	突变率	70%	59.3%	33.3%
10 ⁻²	菌落数	18	7	2
	突变株	13	4	0
	突变率	72%	57.1%	—
10 ⁻³	菌落数	1	0	0
	突变株	1	—	—
	突变率	100%	—	—

表3 J₁₋₃ 正变率

		照射时间 (s)		
稀释度		45s	90s	120s
10 ⁻¹	突变株	23	10	2
	正变株	4	1	2
	正变率	17.4%	10%	100%
10 ⁻²	突变株	6	3	—
	正变株	1	2	—
	正变率	16%	66.7%	—
10 ⁻³	突变株	3	—	—
	正变株	1	—	—
	正变率	33%	—	—

表4 Z₃₅₋₈ 45 s 正变率

		照射时间 (s)		
稀释度		45s	90s	120s
10 ⁻¹	突变株	28	16	3
	正变株	15	3	—
	正变率	53.6%	18.75%	—
10 ⁻²	突变株	13	4	0
	正变株	7	1	—
	正变率	53.6%	25%	—
10 ⁻³	突变株	1	—	—
	正变株	1	—	—
	正变率	100%	—	—

斑点则是杂质。由于，层析缸中展开液量少、饱和度不够会产生拖尾现象，导致上端凸出，下端凹陷，迁移距离有偏差。有时，可能是实验真菌的代谢产物复杂，导致斑点与斑点并没有全部分离开。出现此类情况时，应采用高效液相色谱仪进行再分析，定量和定性。

参考文献

[1] 周东坡, 平文祥, 孙剑秋, 等. 紫杉醇产生菌分离的研究, 微生物学杂志, 2001, 21 (1): 18-19.

[2] Jones WB, Schneider J, Shapiro F et al. Treatment of resistant gestational choriocarcinoma with Taxol: A report of two cases. Gynecol Oncol, 1996, 61 (1): 126-130.

[3] Sun W, Liu AY, Liang ZQ. Breeding for the high-yield Monacolin K strains of Monascus sp. by the mutagenesis of UV & LiCl. Journal of Huazhong Agricultural University, 2004, 23 (1): 168-170.

[4] Zhao K, Zhou DP, Wang W. Effect of the component of culture on taxol-producing stain Nodulisporium Sylviforme for the yield of taxol. Journal of Fungal Research, 2003(12): 18-20.

诱变实验。结果表明: J₁₋₃在照射90s时是最佳时间, Z₃₅₋₈ 45 s辐射时间为45 s最好。今后, 可在此基础上继续进行筛选, 以得到高产菌株。

3.1 诱变前后菌落形态 J₁₋₃诱变前菌落呈白色, 背面为浅黄色。诱变后, 菌落有明显变大或变小, 背面颜色较浅, 5 d后呈现亮白色。且生长速度加快。Z₃₅₋₈ 45s诱变前菌落为白色丝状, 背面红色。诱变后, 菌落直径明显变大, 依然为白色菌丝, 背面色红。

3.2 致死率、诱变株及正变株 随着照射时间的延长, 致死率明显上升, 证实紫外线的辐射对J₁₋₃、Z₃₅₋₈ 45 s有影响。正突变率明显较负突变率少, 紫外辐射虽然造成原始菌的改变, 但是, 正向突变的菌株比负向突变的菌株少。

3.3 层析 与标样具有相同蓝斑、迁移距离相等或相距很小的试样证实是紫杉醇。红斑可能是紫杉醇的类似物。而其他颜色